

(11)Publication number : 57-005693

(43)Date of publication of application : 12.01.1982

(51)Int.Cl. C12P 13/10
// C12N 15/00
C12P 19/34
(C12P 13/10
C12R 1/185)

(21)Application number : 55-079959

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 13.06.1980

(72)Inventor : MOMOSE HARUO
ISHIDA MASAOKI
TERABE MASATO

(54) PRODUCTION OF L-ARGININE THROUGH FERMENTATION PROCESS

(57)Abstract:

PURPOSE: The vector in which the arg A gene controlling N-acetylglutamic acid synthetase is built is included in a DNA acceptor in Escherichia and the microorganism is cultured, then the titled substance is collected from the culture mixture.

CONSTITUTION: The arg A gene that controls N-acetylglutamic acid synthetase is extracted from a microorganism in Escherichia. The gene is built in the vector- DNA that is obtained from the plasmid of Escherichia, then included in the DNA acceptor in Escherichia. The resultant L-arginine-producing microorganism is cultured in a usual medium containing carbon source, nitrogen source, inorganic ions and aminoacids aerobically until the accumulation of L-arginine stops. L-arginine is collected from the culture mixture by a usual method.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57—5693

60 Int. Cl.³

識別記号

厅内壁面编号

●公開 昭和57年(1982)1月12日

C 12 P 1370

6712-4 B

全明の数 1

PC 12 N 15/00

7235-4 B

資產請求 未請求

C 12 P 19/34

6712-4 B

(C 12 P 13/10

(全 4 頁)

④発酵法によるL-アルギニンの製造法

川崎市川崎区観音2丁目20-8

44 順 昭55-79959

發明者 寺部真人

出 願 昭55(1980)6月13日

横浜市緑区美しが丘1丁目14番
地

明者 百瀬春生

出 願 人 味の素株式会社

鎌倉市玉環 2 丁目 24-2

東京都中央区京橋1丁目5番8号

⑫発 明 者 石田雅昭

号

價 值 觀

1. 電解の名称 貴州法によるシーアルギョンの製造法

2. 竹前鎮水の経路

エシエリヒア属の微生物より得たN-アセチルグルタミン酸合成酵素を互配するもの。A遺伝子を組み込んだベクターを含有し、レーアバ菌に生産を有するエシエリヒア属の微生物を培養し、培養液中に溶解されたレーアルニンを回収することを特徴とする発酵法によるレーアルバ菌の新産法。

2. 見解の採擧と説明

この発明は発露法によるアムギニンの製法に備する。

高純度による γ -アミノアルギニンの製造法に關し、
アスピラタリウム属、コナネバタリウム属、
エシエリヒア属等の富集性が γ -アミノアルギニンを
生産することが知られている。

なれに對し不透明者は、エシエリヒア風の

酸塩基より得た N-アセチルグルタミン酸成糖
素を支配する arg 遺伝子 (Bacteriological
Reviews, Vol. 40, 116-127, March, 1975)

を認め、ひんたペクター¹⁾を含有するエノエリにアロ
の微生物が、上記ペクターを含有しない通常のエ
ノエリヒブ属のシアロゲルム生産能を有する重
具糖より高い収率でシアロゲルムを生産するこ
とを知つた。

本発明のアルギニン生産能を有する微生物を飼育するには、少なくとも argA 遺伝子を有するエシエリヒア属の微生物を DNA 供体菌とし、これより細胞の染色体 DNA 抽出液より染色体 DNA を抽出する。

DNA 修飾薬としては、N-アセチルグルタミン酸合成酵素阻害性のより高いものとして、L-アスパラギン自身による遺伝阻害のないものが好ましい。このような面では多くの場合、L-アスパラギン生合成能が高く、ローメチルメチオラン、p-フルオロフェニルアラニン、D-アスパラギン、アルギニンヒドロキシル酸、S-(2-アミノエチル)-N-

メチリン、モノメチルセリン、β-アミノアラニン、アラニン、グルタミン酸等の基質に制限を有する変異株として得ることがある。

抽出された染色体DNAは、制限エンドヌクレアーゼにより、適宜切断される。制限エンドヌクレアーゼは、反応時間を調整すれば、多くのものが使用できる。

ベクター-DNAとしては、エンテロコッカス・ファエカリスのプラスミドより得られたものを用いてもよい。

このベクター-DNAは、制限酵素を用いて、組み込む方法、特定の条件を用いて、

かくして得られたハイブリッドプラスミドを、エンテロコッカスのDNA変異株に含有せしめる方法も又、従来知られているすべての形質転換方法が、希少な変異があつてもいずとも適用できる。

上記ハイブリッドプラスミドの変異株としては、エンテロコッカスのシューバチン遺伝子座 (argA 変異株) が、目的とする形質転換を選択・分離するのに好都合なので適用されるが、シューバチン

遺伝子を要求せず、特に更に特定の基質の代謝に制限を有し、かつシューバチン産生能の低い菌株を欠陥せしめた arg⁺ 変異株を要求として用いれば、よりシューバチン産生能の低い菌株が得られる。この場合の形質転換の選択・分離も、特定の条件を要せず、ベクター-DNAが有する性質及び必要により変異株が有している性質を考慮して選択・分離すればよい。

更にシューバチン産生能の低い変異株を得るために、arg⁺ R, C, D, E, F, G, H, I 遺伝子 (Biochemical Reviews, Vol. 40, 115-167, Maeh, 1974) を行動的にベクターに組み込ませたハイブリッドプラスミドを用いて形質転換するのが好ましい。又変異株又は形質転換を人工変異誘起して、シューバチンの分解性を低下せしめるような変異を起せしめるのも効果的である。

かくして得られたシューバチン変異株を培養する方法は、従来のシューバチン生産株の培養方法と特に異なる。即ち、用途としては、成

菌、変異株、細胞イオン、更に必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機酸変異株を含有する培養のものである。培養法としては、グルコース、シュクロース、ラクトース等及びこれらを含有する酵母加水分解液、肉質、ホエイ等を用いられる。培養法としては、アンモニウム塩、アンモニウム水、アンモニウム塩その他が使用できる。また、塩化ナトリウム、クエン酸、酢酸、グルコン酸、酒石酸、リン酸等の有機酸を添加すれば、より好ましい結果が得られる場合が多い。

培養は好気的条件下で温度の pH 及び湿度を適宜調整しつつ、実質的にシューバチンの生産速度が停止するまで行われる。

かくして培養液中には希少なシューバチンが生成変換される。培養液よりシューバチンを選択するには適宜の方法が適用できる。

本発明の最良例を用いることにより、従来知られているエンテロコッカス・ファエカリスのシューバチン生産株を用いる場合と比べ、シューバチンの生産速度が大幅に向上し、更にシューバチン

以外のアミノ酸の生産が強く、シューバチンの分解・利用の面にも都合である。

実施例 1

(1) argA 変異株を用いた染色体 DNA の抽出

AJ 11534 株 (エンテロコッカス・ファエカリス ATCC 14928) より変異誘起したシューバチンヒドロキシル酸耐性株 (arg⁺ 変異株が導入されている) を 1.5 のしぼり (ペプトン 1.5g, 酵母エキス 0.5g, グルコース 0.1g, NaCl 0.5g, pH 7.2 に調整) を 37°C で 24 時間培養後、対数増殖期の菌体を集菌後、フェノール法による通常の DNA 抽出法によつて染色体 DNA を抽出精製し、最終 1.2 ml を得た。

(2) ベクター-DNA の調製

ベクターとしてアンピシリン耐性、テトラサイクリン耐性をマーカーとしてもつプラスミドの pBR322 の DNA を次のようにして調製した。まず、pBR322 をプラスミドとして得たエンテロコッカス・ファエカリス 1.2 株の菌を 1.5 のし

ムコース、サザノ根・無菌培養地（グルコース 2g、 NH_4Cl 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、 KH_2PO_4 3g、 NaCl 5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1g）を100mlの水に溶解し、pH 7.2に調整したものを基本培地として用い、これにシロイソナデ 0.05g、アミノ酸 0.05g、サザノ根 100mg等、使用量の必要栄養物質、生育促進物質を添加して使用し、37℃で2日間培養後、2日間静止したものを170μl/mlのグルコースを加え、更に培養した。16時間後、菌液を、93℃、30分加熱によって滅菌させ、3000×g 1時間の遠心により上清を得た。これよりプラスミドDNAを抽出し、セクションライドエタジラムブロマイド平板電気泳動法により、最終に0.05μlのpBR322プラスミドDNAを分離した。

(4) 染色体DNA断片のベクターへの挿入

(i) 得た染色体DNA 30μlをとり、制限エンドヌクレアーゼBamHI、HindIII、BclI、

SmaIをそれぞれ用い、37℃で1分、30分、60分、120分反応させ、DNA断片の反応を切断した。中で得たベクター-DNAの場合は120分反応させ、更に切断せしめた。400μlの熱滅菌水、各染色体断片反応とベクター切断反応を混合し、ATP及びジチオスレイトール存在下、T4アダーゼ由来のDNAリガーゼによって10℃、24時間DNA断片の連結反応を行った。40℃、30分の熱滅菌後、各反応液に25%のメタノールを加えて遠心分離したものをDNAと分離した。

(ii) *argA* 遺伝子を担ったプラスミドによる細胞変換

細胞変換のための受容体として、*argA* 遺伝子産物であるN-アセチルグルタミン酸合成酵素の欠陥したアルギニン要求性菌株（*argA*⁻株）の1株を用いた。*argA* 遺伝子は、染色体地図上60分の位置にあり、リジン合成を支配する lysA 遺伝子（61分）とは近接しているため、エンズリミア・コリーロー12株からエタジラム

アミン変異処理して得たアルギニン要求性の中から*argA*と*lysA* 遺伝子の同時変異体（コトランスマutations）産生を示す株を1-2株ずつ選出アアジを用いて選ぶことにより容易に目的の*argA*⁻株を得ることができる。

さて、かくして得られた*argA*⁻株を13株を100μlに懸濁し、37℃で熱滅菌後を行い、対照培養期間中まで生育させた後、これを水浴中0.1M MgCl_2 、0.1M CaCl_2 、各50μlに懸濁させることによりゆるいコンビタント（DNA取り込み能を有する）細胞を調製した。このコンビタント細胞懸濁液に、(i)で得たDNA（アルギニン要求性*argA*⁻変異遺伝子を担ったプラスミドDNAが含まれる）の懸濁液を加えて氷冷下30分反応させ、遠心（2000×g、2分）の後に上清を除去し、再び氷冷下30分放置してDNAを細胞内に取り込ませた。つぎに、この細胞懸濁液の一定量を所定なし培地に播種し、37℃、3日間培養後、行つて菌液を100μlに希釈し、希釈液を、再懸濁液を

定量最少培地プレート（グルコース2g、 NH_4Cl 50、1g、 KH_2PO_4 7g、 KH_2PO_4 3g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、サザノ根2g）を100mlの水に溶解し、pH 7.2に調整したものを基本最少培地とし、これに水25mlを加えて調整した懸濁液（培地）に代換し、37℃、3日間培養した。生じたコロニー（アルギニン要求性）を調製し、再び最少培地上で培養し、アミノリン20μl/ml含有する培地プレート上でpBR322に由来するアミノリン耐性マーカーの遺伝子を転写した（用いた制限酵素はいずれも10μlマーカーを失活させない。アミノリン培地プレート上で生育しなければならぬ）。かくして得られたアルギニン要求性でアミノリン耐性の株17株につき、対照培養後よりアルギニン要求性を検定したところ、いずれもアルギニン要求性を示した。このことは、染色体DNA上の*argA* 遺伝子領域が、pBR322プラスミドのDNAに挿入されて生じた所産プラスミドDNAを取り込んだ細胞のみがコロニーとして増殖され、

しかもそれらがアルギニン通列生成性を有していることを実証する。

(B) 新規アルギニン中量産菌株によるL-アルギニン生産

(B)で得られた菌株のうちAJ 11593 (FERM-P 5616)株を用いてL-アルギニンを発酵生産した試験結果を第1表Aに示した。発酵は500mlアラスカ中アルギニン生産培地(グルコース5g/g, $(NH_4)_2SO_4$ 2.5g/g, KH_2PO_4 0.2g/g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g/g, 酵母エキス0.05g/g, サイアミン塩酸塩1.000mg/g, $FaSO_4 \cdot 7H_2O$ 1mg/g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 1mg/g, 炭酸カルシウム2.5g/g(別投与)、 KOH によりpH 7.0に調整)を200ml投入し、これに菌体を10g投入し、30℃、3日間連続培養して行つた。培養液の遠心分離中のL-アルギニンは、バイオアッセイ法で定量した。

併せて発酵を行い、その結果を第1表Cに示した。6日間の培養より、新規アルギニン生産株AJ 11594は、菌株AJ 11534株に対して顕著な生産性の増進を示している。

なお、かくして得られた新規アルギニン生産株AJ 11594株より再び新規アラスカ中量産菌株1の用いて述べたのと同様の方法によつて分離選抜し、アミノースグル電気泳動法により既知の菌株のアラスカと比較して分子量を測定したところ、3.7ノガルトンと算出された。したがつてpBR322(2.6ノガルトン)からの増分1.1ノガルトンのDNA部分に、アルギニン通列生成性を支配する $argA$ 変異遺伝子が存在していると考えられる。

第1表 L-アルギニン生産試験

	菌株	L-アルギニン生産量 (mg/g)
A	AJ 11593	6
B	AJ 11594	190
C	AJ 11534	75

特許出願人 味の素株式会社

実施例2

実施例1で得られたアルギニン生産株AJ 11593株のもつ新規アラスカ中量産菌株1の用いて述べたのと同様の方法によつて分離選抜し、これを(B)で述べたのとほぼ同様の方法によつて今度は菌株AJ 11534株(アルギニン非要求性で、アルギニンを代謝阻害因子に敏感変異(arg^R)をもち、且つL-アルギニンヒドロキシル化能のないアルギニン生産菌)へ形質転換により導入した。この際、新規アラスカ中量産菌株1の用いて述べたのと同様の方法によつて分離選抜したアルギニン非要求性マーカー(arg^R)は利用できないので、pBR322ゲノム中のマーカーであるアンピシリン耐性を利用し、アンピシリン300μg/ml含有のし培养基プレート上で目的とする形質転換株を選択分離した。得られた形質転換株AJ 11594(FERM-P 5617)を用い、実施例1の(B)で述べたのと同様の方法でL-アルギニンの発酵生産試験を行つた結果を第1表Bに示した。対照として、新規アルギニン生産株の菌株であるAJ 11534株を用い、同様の条